

⑫ 公開特許公報(A)

平2-280061

⑤Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬公開 平成2年(1990)11月16日

G 01 N 33/574
A 61 B 10/00
G 01 N 33/543

A 7906-2G
T 7831-4C
P 7906-2G

審査請求 未請求 請求項の数 22 (全17頁)

⑭発明の名称 微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定方法および測定用器材

⑰特 願 平1-101048

⑱出 願 平1(1989)4月20日

⑲発明者 片 峯 奉 章 埼玉県浦和市南浦和2-39-12 アーバンアイコー603

⑲発明者 佐 藤 浩 埼玉県北葛飾郡鷺宮町桜田3-1-1 3-201

⑲発明者 持 田 英 東京都豊島区駒込2-5-4

⑲出願人 持田製薬株式会社 東京都新宿区四谷1丁目7番地

⑲代理人 弁理士 渡辺 望稔 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の
測定方法および測定用器材

2. 特許請求の範囲

(1) 微量の乳頭分泌液中に含まれるCA15-3、CA125、CA72-4、CA54/61、CA602、CA19-9、TPA(Tissue Polypeptide Antigen)、MCA(Mucinous Carcinoma-associated Antigen)、MSA(Mammary Serum Antigen)およびATM-1からなる群から選ばれた成分の濃度を、該選ばれた成分に対する抗体または抗体分画を用いた抗原抗体反応により測定する方法であって、シート状固相で前記抗原抗体反応を行うことを特徴とする微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定方法。

(2) 前記シート状固相に、前記CA15-

3、CA125、CA72-4、CA54/61、CA602、CA19-9、TPA、MCA、MSAおよびATM-1からなる群から選ばれた成分に対する抗体または抗体分画が不溶化されている請求項1に記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定方法。

(3) (a) 前記シート状固相上に、前記CA15-3、CA125、CA72-4、CA54/61、CA602、CA19-9、TPA、MCA、MSAおよびATM-1からなる群から選ばれた成分に対する抗体または抗体分画を不溶化させて固定し、

(b) 乳頭分泌液検体を採取し、該検体を前記固相上の所定の反応領域内に塗布することにより、前記領域内に不溶化されている前記抗体または抗体分画と接触させ、

(c) 前記検体と前記抗体または抗体分画との反応物が該固相上で乾固した後、もしくは乾固する前に、該反応物に、前記選ばれた成分に対する抗体または抗体分画に識別可能な標

識剤を結合させた標識物を接触させ、

(d) 前記固相を洗浄することにより、固相に不溶化させた抗体または抗体分画に結合しなかった検体成分および標識物を除去し、

(e) 前記固相に結合した前記標識物の量から、乳頭分泌液中の前記選ばれた成分の濃度を測定する、請求項1または2に記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定方法。

(4) 前記シート状固相に不溶化させた前記CA15-3、CA125、CA72-4、CA54/61、CA602、CA19-9、TPA、MCA、MSAおよびATM-1からなる群から選ばれた成分に対する抗体または抗体分画と検体との接触、および検体と標識物との接触を同時に行なわせる請求項1または2に記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定方法。

(5) 乳頭分泌液検体と、該乳頭分泌液検体中の前記CA15-3、CA125、CA72-4、CA54/61、CA602、CA19-9

(9) 前記プラスチックが、ポリエステル、ポリプロピレンまたはポリエチレンである請求項8に記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定方法。

(10) 前記シート状固相に、CA15-3、CA125、CA72-4、CA54/61、CA602、CA19-9、TPA、MCA、MSAおよびATM-1からなる群から選ばれた1種以上の成分に対する抗体または抗体分画を不溶化させた後、該抗体または抗体分画と、被測定物質である該選ばれた1種以上の成分との間の抗原抗体反応には全く関与しない物質でシート状固相をコートする請求項2~9のいずれかに記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定方法。

(11) 前記識別可能な標識剤が酵素であり、前記標識物の測定が、該酵素の酵素反応の結果、増加するか、もしくは、減少する物質量の測定によってなされる請求項1~10のいずれかに記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定

9、TPA、MCA、MSAおよびATM-1からなる群から選ばれた成分に対する抗体または抗体分画に識別可能な標識剤を結合させた標識物とを混合した後、該混合物を前記シート状固相に不溶化させた前記選ばれた成分に対する抗体または抗体分画と接触させる請求項1または2に記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定方法。

(6) 前記乳頭分泌液検体の採取が、該シート状固相を直接乳頭へ接触させることにより行なわれる請求項1~3のいずれかに記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定方法。

(7) 前記乳頭分泌液検体の採取が、採取用器具を介して行なわれる請求項1~5のいずれかに記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定方法。

(8) 前記シート状固相が、実質的に液体不透過性のプラスチック製シートである請求項1~7のいずれかに記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定方法。

方法。

(12) 前記特定物質濃度の測定が、肉眼または物理的方法を用いて半定量的にもしくは定性的に行なわれる請求項1~11のいずれかに記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定方法。

(13) 前記特定物質濃度の測定が、物理的に定量的に行なわれる請求項1~11のいずれかに記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定方法。

(14) シート状固相であって、該固相に、乳頭分泌液中のCA15-3、CA125、CA72-4、CA54/61、CA602、CA19-9、TPA、MCA、MSAおよびATM-1から選ばれた1種以上の成分に対する抗原抗体反応のための少なくとも1つの反応領域を有することを特徴とする微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定用器材。

(15) 前記反応領域に、前記CA15-3、CA125、CA72-4、CA54/61、

CA 602、CA 19-9、TPA、MCA、MSAおよびATM-1から選ばれた1種以上の成分に対する抗体または抗体分画が不溶化されている請求項14に記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定用器材。

(16) 前記シート状固相が、さらに、前記選ばれた1種以上の成分に対する抗体または抗体分画に識別可能な標識剤を結合させた標識物を有する請求項15に記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定用器材。

(17) 前記シート状固相が、実質的に液体不透性のプラスチック製シートである請求項14~18のいずれかに記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定用器材。

(18) 前記プラスチックが、ポリエステル、ポリプロピレンまたはポリエチレンである請求項17に記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定用器材。

(19) 前記シート状固相の前記反応領域が、該シート状固相に設けられた凸部の枠で囲われて

いる請求項14~18のいずれかに記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定用器材。

(20) 前記シート状固相の前記反応領域が、該シート状固相に設けられた凹部である請求項14~18のいずれかに記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定用器材。

(21) 前記識別可能な標識剤が、色素、放射性同位体元素、酵素または蛍光物質のいずれかである請求項16~20のいずれかに記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定用器材。

(22) 前記反応領域が、さらに、前記抗体または抗体分画と被測定物質である前記選ばれた1種以上の成分との間の抗原抗体反応には実質上関与しない物質でコートされてなる請求項15~21のいずれかに記載の微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定用器材。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、超微量の乳頭分泌液検体中の腫瘍関連抗原であるCA 15-3、CA 125、CA 72-4、CA 54/61、CA 602、CA 19-9、TPA、MCA、MSAおよびATM-1の測定方法、およびその方法を実施するための測定用器材に関する。

[従来の技術]

現在、きわめて多数の腫瘍マーカー、即ち、腫瘍関連抗原が報告され、その血中濃度の測定が実施されている。なかでも、Gold等(J. Exp. Med., 121, 439, 1965)により報告されたCEA (carcinoembryonic antigen) は、最も広く用いられている腫瘍関連抗原であり、CEAの血中濃度の測定は、癌患者の術後追跡や各種治療の効果判定などに有効であるとされている。現在、これらの腫瘍関連抗原の血中濃

度測定には、radio immunoassay (RIA) や enzyme immunoassay (EIA) による定量反応が用いられている。しかしながら、CEAを始めとして他のいずれの腫瘍関連抗原の血中濃度測定によっても、早期の癌を発見することは非常に困難である。特に、現在までに知られている腫瘍関連抗原は、いずれもその特異性が高いとは言えず、従って、単一の腫瘍関連抗原の血中濃度測定では、診断に正確を期することは困難であった。

乳癌は、増加傾向にある主要な癌の1つでありながら、血中の腫瘍関連抗原の測定では、乳癌の腫瘍関連抗原であるCA 15-3を測定しても、早期癌での陽性率が4~8%と極めて低く、原発性の早期乳癌の発見は非常に困難であった(セントコアCA 15-3 RIAキット研究会集計資料)。その為、発見時には癌が進行していたり、リンパ節などに転移を起こしている症例が多く、やむをえず乳房切除術などの治療を必要とする場合が多かった。

稲治等（医学のあゆみ、134、575、1985）は、乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原であるCEAの測定を行い、乳癌早期診断が可能であることを報告している。この方法は、EIA（エルモテック-CEA；持田製薬（株））で乳頭分泌液中CEAを測定するものである。ここで行われているCEAの測定方法は、反応装置や反応の結果を測定するための分光光度計などの機器を必要とするため、どの施設でも簡単に測定できるというものではなかった。さらに、この方法では、検体数の多い少ないにかかわらず、その都度検量線を作成する必要があるため、乳頭異常分泌症のように検体数が比較的少ない場合には、効率の悪い方法であった。さらに、現在のCEA測定用EIA試薬は、検体量が最も少量で済むエルモテック-CEAでさえ、50 μ Lは必要である。しかし、乳頭分泌液は、通常、分泌液量が少なく、採取できる量は多くともせいぜい10 μ L程度にすぎない。また、血清検体と異なり、その性状も多種多様で

測定操作が簡便であることといった社会的要求を満たす乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原（CA15-3、CA125、CA72-4、CA54/61、CA602、CA19-9、TPA、MCA、MSAおよびATM-1からなる群から選ばれた成分）の測定手段を開発すべく研究を重ねた結果、従来のEIA法における不溶化抗体の担体および反応の場として、シート状の材料を用いることにより、前記の問題点を克服できることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

本発明の目的は、生体分泌液、特に微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原であるCA15-3、CA125、CA72-4、CA54/61、CA602、CA19-9、TPA、MCA、MSAおよびATM-1からなる群から選ばれた成分を、抗原抗体反応を用いた免疫測定法によって簡便に検出または定量する方法およびこの方法を実施するに必要な測定用器材を提供することにある。そして、これらの方法お

あり、特にその粘稠度の差異が大きく、採取が困難な症例もある。そのため、検体量が微量すぎて測定できない場合も多く、超微量でも実施可能な測定手段の開発が望まれている。

こうした背景にあって、乳癌に対する検出力および特異性の高い診断法の開発に対する社会的要求は非常に高く、とりわけ、集団検診や乳腺外来などでの乳癌のマスクリーニングに容易に利用できる腫瘍関連抗原測定手段の開発が切望されている。そして、この分野で乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原を測定することは意義が大きく、誰にでも簡便な手法で乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原が的確に測定できるようになれば、臨床上非常に有意義である。

〔発明が解決しようとする課題〕

本発明者らは、上述の乳癌診断における問題点に鑑み、これらの問題点を解決し、検体量が微量でも測定可能であること、集団検診やマスキリーニングで容易に利用可能であること、

および器材を用いることによって、特に乳癌の早期診断を可能にし、社会的要求に応えるものである。

〔課題を解決するための手段〕

すなわち、本発明の第一の態様は、微量の乳頭分泌液中のCA15-3、CA125、CA72-4、CA54/61、CA602、CA19-9、TPA（Tissue Polypeptide Antigen）、MCA（Mucinous Carcinoma-associated Antigen）、MSA（Mammary Serum Antigen）およびATM-1からなる群から選ばれた成分の濃度を、その選ばれた成分に対する抗体または抗体分画を用いた抗原抗体反応により測定する方法であって、シート状固相上で前記抗原抗体反応を行うことを特徴とする微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定方法を提供するものである。

また、本発明の第二の態様は、シート状固相であって、該固相上に、乳頭分泌液中のCA

15-3、CA125、CA72-4、CA54/61、CA602、CA19-9、TPA、MCA、MSAおよびATM-1からなる群から選ばれた1種以上の成分に対する抗原抗体反応のための少なくとも1つの反応領域を有することを特徴とする微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定用器材を提供するものである。

ここで、前記シート状固相が、実質的に液体不透過性のプラスチック製シートであり、前記プラスチックが、ポリエステル、ポリプロピレンまたはポリエチレンであることが好ましい。

以下に、本発明の構成を詳細に説明する。

本発明の測定方法は、微量の乳頭分泌液中のCA15-3、CA125、CA72-4、CA54/61、CA602、CA19-9、TPA、MCA、MSAおよびATM-1からなる群から選ばれた1種以上の成分（以下、単に腫瘍関連抗原ということがある）の濃度を、

作により除去し、該シート状固相に結合した標識物の量から腫瘍関連抗原の濃度を測定する、いわゆるサンドイッチ法を基本構成とする。しかし、サンドイッチ法に限定されるものではない。

サンドイッチ法に基づかない変法として、例えば、抗体を不溶化させていないシート状固相を用いる方法も可能である。この場合には、採取した検体を抗体を不溶化させていない固相上の所定の領域内に塗布し、検体が固相上で乾固した後、または乾固する前に、これに、抗体に識別可能な標識剤を結合させた標識物を反応させる。次いで、この固相を洗浄し、固相に結合しなかった検体成分および標識物を除去し、固相上の所定の領域内に結合した標識物の量から、検体中の腫瘍関連抗原の有無または量を測定する。

サンドイッチ法では、固相上の抗体を不溶化させてある領域に、乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原を抗原抗体反応により結合させるので、乳頭

抗原抗体反応により測定する方法であり、この測定をシート状固相上で行うことに特徴がある。

本発明法では、後述するシート状固相を用いるので、微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定が初めて可能となった。ここで、微量とは、0.2～50μL程度の液量をいう。また、本発明法では、患者らから採取した乳頭分泌液を、そのままの濃度で用いてもよいし、2～100倍程度に希釈して用いてもよい。

本発明の好ましい方法は、検出または定量しようとする乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原に対する抗体または抗体分画（以下、両者を含めて単に抗体という）を結合させた実質的に液体不透過性のシート状固相に乳頭分泌液を塗布し、検体と不溶化抗体とを反応させた後、これに前記腫瘍関連抗原に対する抗体に適当な手段で識別可能な標識剤を結合させた標識物を反応させ、その後、固相上に不溶化させた抗体に結合しなかった乳頭分泌液成分および標識物を、洗浄操

分泌液中の該腫瘍関連抗原以外の成分の影響を受けにくい。さらに、抗体を不溶化していない固相を用いる方法に比して、測定感度が高い。また、測定感度または測定可能な濃度範囲を調節するのが容易である。従って、固相担体上に抗体が不溶化されているサンドイッチ法が望ましい。

また、本発明に用いるサンドイッチ法は、シート状固相上に不溶化させた抗体と検体と標識物との3成分の反応の順序の相違に関し、3種の変法が可能である。

第一の方法は、検出または定量しようとする乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原に対する抗体を結合させたシート状固相に乳頭分泌液検体を塗布し、検体と不溶化抗体とを反応させた後、これに前記腫瘍関連抗原に対する抗体に適当な手段で識別可能な標識剤を結合させた標識物を反応させ、その後、固相上に不溶化させた抗体に結合しなかった乳頭分泌液成分および標識物を、洗浄操作により除去し、該シート状固相に結合

した標識物の量から腫瘍関連抗原の濃度を測定する。

第二の方法は、抗体を不溶化させたシート状固相上に、抗体に識別可能な標識剤を結合した標識物を予め塗布しておき、このように処理した固相上の所定の領域内に乳頭分泌液検体を塗布し、検体成分と不溶化抗体との反応および検体成分と標識物との反応を同時に行なわせる方法である。この場合、必要であれば、抗体を不溶化させた固相に標識物を塗布した後に凍結乾燥を行うと、標識物等の試薬の安定性を増加させる。

第三の方法として、採取した乳頭分泌液検体と、抗体に識別可能な標識剤を結合させた標識物とをあらかじめ混合した後に、これを、抗体を不溶化させた固相上の所定の反応領域内に塗布して反応させる方法も可能である。

本発明の測定方法の対象は、腫瘍関連抗原であるCA15-3、CA125、CA72-4、CA54/61、CA602、CA19-

細胞株LS174Tより精製されたTAG-72に対するモノクローナル抗体(CC49)によって認識される腫瘍関連抗原である。

CA54/61は、野澤等により見いだされた人肺腺癌由来細胞株C1509に対するモノクローナル抗体(MA54、MA61)によって認識される腫瘍関連抗原である。

CA602は、野澤等により見いだされた人卵巣類中腎癌培養細胞株RMG-IIに対するモノクローナル抗体(F602-1、6)により認識される腫瘍関連抗原である。

CA19-9は、Koprowski等により見いだされた人結腸癌由来細胞株SW1116に対するモノクローナル抗体(1116NS19-9)により認識される腫瘍関連抗原である。

T P A (Tissue Polypeptide Antigen) は、Björklund等により見いだされた分子量約22 kDaの1本鎖のポリペプチドで、腫瘍細胞、胎盤、胎児等の増殖細胞の主として細胞膜に局在している癌胎児性抗原である。

9、T P A、M C A、M S A および A T M - 1 であるが、その他に、人乳汁中脂肪球被膜上の糖蛋白質、例えばM A M - 6やG C D F P - 15なども、本発明と同様の原理で測定できる。

次に、前記腫瘍関連抗原について、さらに詳細に説明する。

CA15-3は、Hilkens等により見いだされた人乳の脂肪球被膜上の糖蛋白質M A M - 6に対するモノクローナル抗体(115D8)と、Kufe等により見いだされた人乳癌細胞の膜成分に対するモノクローナル抗体(DF3)によって認識される腫瘍関連抗原である。

CA125は、Bast等により見いだされた人卵巣漿液性囊胞腺癌培養細胞O V C A 4 3 3に対するモノクローナル抗体(OC125)により認識される腫瘍関連抗原である。

CA72-4は、Colcher等により見いだされた人乳癌肝転移癌細胞の膜成分分画に対するモノクローナル抗体(B72.3)と、人結腸癌培養

M C A (Mucinous Carcinoma-associated Antigen) は、Stähli等により見いだされた人乳癌細胞株H s 0 5 7 8 T、S K - B R - 3、M C F - 7、Z R - 7 5 - 1に対するモノクローナル抗体(b-12,b-8,b-15)により認識される腫瘍関連抗原である。

M S A (Mammary Serum Antigen) は、Stacker等により見いだされた人乳癌組織より分離した癌細胞に対するモノクローナル抗体(3E1.2)によって認識される腫瘍関連抗原である。

A T M - 1 は、海江田等により樹立された活性化キラーT細胞5 B 5の認識する抗原であり、人乳癌由来細胞株N B T - 2に対するモノクローナル抗体(N1977)によって認識される腫瘍関連抗原である。

これらの腫瘍関連抗原に対する抗体は、市販のものを利用することもできるが、常法に従って作製することもできる。

本発明の方法において、抗体とは、精製抗体

に限定されるものではなく、該腫瘍関連抗原との結合活性を有する抗体を含有する抗血清もしくは塩析抗体等の粗精製物も含む。抗体分画として使用できるのは、該腫瘍関連抗原との結合活性を有する抗体分子の部分成分で、例えば、Fab、F(ab')₂が使用できる。また、抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。測定対象の腫瘍関連抗原の性状に応じ、適切な抗体を選択すればよい。

抗体を固相に結合させるには、物理的に結合させても化学的に結合させてもよい。例えば、抗体溶液中に固相を浸し、4～56℃で0.5～24時間、好ましくは37～50℃で1～2時間インキュベートして物理的に結合させる。用いる抗体の濃度は、精製抗体または精製抗体分画の場合、1μg～100mg/mlであればよく、1～100μg/mlが好ましい。固相の抗体溶液への浸漬後の乾燥手段は、風乾燥でも、凍結乾燥でもよい。しかしながら、抗体

度の前記腫瘍関連抗原で実質的に飽和されるような量の抗体をこの領域内に不溶化すると、判定を容易にかつ厳密に行うことができる。別の例として、検体中に含有されている前記腫瘍関連抗原をある濃度範囲で定量もしくは半定量する必要がある場合には、その必要な濃度範囲の上限濃度で、領域内に不溶化されている抗体の総抗原結合部位が実質的に飽和されるような量の抗体を該領域内に不溶化すると、判定を容易にかつ厳密に行うことができる。

本発明法に用いる標識物は、乳頭分泌液中の前記腫瘍関連抗原に対する抗体または抗体分画に、識別可能な標識剤を結合させたものである。

抗体に付ける識別可能な標識剤として、色素、放射性同位体元素、酵素、もしくは蛍光物質が使用できるが、安定性、検出感度、安全性、および取り扱いが容易である点などから、酵素が好適である。酵素としては、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ

を固相上へ不溶化する方法はこれに限定されるものではなく、塗布操作および洗浄操作などの通常の測定操作によって固相上から抗体が実質的に脱離しないように、固相上に抗体を固定化する手段をすべて含む。

抗体をシート状固相に不溶化させた後、チトクロームc溶液を加熱変性させたものや、BSA(ウシ血清アルブミン)、HSA(ヒト血清アルブミン)、動物血清、脱脂粉乳など、乳頭分泌液中の前記腫瘍関連抗原との抗原抗体反応には全く関与しない物質で固相をコートすることにより、非特異的な反応を抑制でき、結果の判定が容易となる。

領域内に不溶化させる抗体の量は、乳頭分泌液中において測定すべき前記腫瘍関連抗原の濃度に対して決定する。例えば、ある濃度(カットオフ濃度)以上の前記腫瘍関連抗原が検体中に含有されている場合にはすべて陽性と判定される測定系では、反応領域内に不溶化されている抗体の総抗原結合部位が、そのカットオフ濃

など一般に酵素免疫測定法において用いられている酵素が使用できる。尚、後述する本発明の測定用器材を用い、多項目同時測定を行う場合も、標識剤は単一のものを用いると、測定手技が簡便となる。

反応結果は、免疫反応後に固相上の腫瘍関連抗原に結合した標識物の量または活性を測定することにより得られる。識別可能な標識剤が酵素の場合には、この標識物の測定は、標識酵素の酵素反応の結果により生じる物質量を測定することにより、簡便に行うことができる。物質量の測定は、反射率計、蛍光光度計、発光光度計などの測定機器を用いて物理的に定量的に行なうこともできる。あるいは、該測定機器による物理的測定の結果を、カットオフ値や数値範囲を設定することによって装置に解析させ、定性的、半定量的に表してもよい。また、該物質が発色物質の場合には、発色の度合を色の濃さによりいくつかの段階に分けて肉眼的に半定量

してもよいし、陰性・陽性のみの定性で判定すれば、より簡便である。

酵素反応によって発色する発色剤としては、一般的に酵素免疫測定法で使用されている発色剤が使用可能である。例えば、ペルオキシダーゼに対しては、2, 2'-アジノジ(3-エチルベンズチアゾリン)-6'-スルホン酸(ABTS)、o-フェニレンジアミン(OPD)、テトラメチルベンジジン(TMB)、5-アミノサリチル酸などがあり、アルカリフォスファターゼに対しては、p-ニトロフェノールりん酸、もしくは、フェニールりん酸を基質として用い、酵素反応によって生成するフェノールを4-アミノアンチピリンとの酸化的共役によって呈色させてもよい。

また、シート状固相上に沈着する性質を有している発色物質で、その色調が経時的に大きく変化しない場合には、判定後も結果を残すことが可能であり、さらに有用である。このような

リエチレン、ポリメチルペンテンなどのプラスチックや、ナイロン膜、ニトロセルロース膜などの合成膜などが挙げられ、紙を上記の材料でコートしたものなども使用可能であるが、ポリエステル、ポリプロピレン、ポリエチレンなどのプラスチックやナイロン膜などが、乳頭分泌液中の被測定物質である前記腫瘍関連抗原以外の成分の非特異的な吸着が少なく、洗浄操作が容易であるなど、取り扱いに便利であるので特に好ましい。また、シート状固相が液体不透過性であると、検体量が超微量であっても固相上の比較的広い面積に検体を塗布することができ、そのため、検体がより多くの抗体と接触することができ、同時に、検体液相の厚みを薄くすることができるため、反応効率が高まるとともに、検体の粘稠性の測定結果への影響を極小に抑えられるという利点も有する。さらに、シート状固相に塗布された検体の非特異的吸着は少なく、非吸着成分は、シート状固相上で乾

発色剤の例として、ペルオキシダーゼに対するジアミノベンジジン、アルカリフォスファターゼに対する5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルりん酸塩(BCIP)など、多種知られている。

本発明では、乳頭分泌液の採取は、通常は吸引ビベットまたはキャピラリで行い、採取した検体を固相上の所定の反応領域に塗布する。この方法であると、検体を採取した乳腺の位置により、疾患の位置を推定できる。また、必要な場合には、超微量の乳頭分泌液を、乳頭から固相上の反応領域に直接採取することも可能である。

本発明は、被測定物質である前記腫瘍関連抗原に対する抗体を不溶化する担体として、また、抗原抗体反応および標識物定量を行なう場として、実質的に液体不透過性のシート状固相を用いる。このような固相の材質としては、ポリエステル、ポリプロピレン、塩化ビニル、ポ

固する前であっても、乾固した後であっても、また、その粘稠性の度合に拘らず、洗浄操作によって容易に除去できるため、乾固の有無や検体の性状の測定結果への影響を極小に抑えられる。これにより、マスキングの場合のように、多数の検体が不定期に生じるような場合には、検体採取時には検体を反応面に塗布するだけで放置し、後でまとめて反応を行えるという自由度が付加された。これらの効果は、シート状固相の材質を実質的に液体不透過性のプラスチックとすることにより、さらに効果的となる。

本発明の測定方法は、本質的には、検体は乳頭分泌液に限定されず、他の生物学的液体、例えば、血清、血漿、尿、唾液、涙、汗、スメアなどにも応用可能であるが、上記の効果から明らかなように、乳頭分泌液のように極微量の検体に対して最も利用価値が高い。

前記腫瘍関連抗原に対する抗体を用い、本発明の測定方法によって乳頭分泌液中の前記腫瘍関連抗原の測定を行うと、従来の血中測定では前記腫瘍関連抗原が検出されなかった早期乳癌患者でも、乳頭分泌液中の前記腫瘍関連抗原濃度は異常高値を示す場合が多く、この乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定は、乳癌の重要な補助診断手段となることが明らかとなった。

例えば、乳癌の場合、従来法による血中 C A 1 5 - 3 の陽性率は、再発乳癌や原発性乳癌の s t a g e IV というような末期癌では 3 8 ~ 5 4 % であったが、原発性乳癌 s t a g e I および s t a g e II では、1 0 % 以下の陽性率を示すに過ぎなかった（セントコア C A 1 5 - 3 R I A キット研究会 1985 - 1986 年集計資料）。ところが、本発明法による乳頭分泌液中の C A 1 5 - 3 の測定では、3 0 0 0 U / m l をカットオフ値とした場合、原発性乳癌でも 4 例中 4 例が陽性を示し、特異性も 8 3 % (5 / 6) と高く、正診率は 9 0 % (9 / 1 0) であっ

た。本発明の測定方法による乳頭分泌液中の前記腫瘍関連抗原の測定によって早期に発見される乳癌症例では、乳房を切除することなく、microdochectomy などの比較的簡単な手術での治療が可能となり、予後も良好である。

次に、本発明法に用いるシート状の固相である本発明の測定用器材について、図面に示す好適実施例に基づいて説明する。

シート状固相の形状は、所定の面積を有する 1 つ以上の反応領域を設けることができるシート状であれば特に限定されず、実施上便利な形状、大きさとすることができる。ここでは、4 種の好適実施例について述べるが、本発明は、これらの例に限定されない。

第 1 a 図に平面図を示し、第 1 b 図に断面図を示す例には、反応領域 2 を 1 つ有するシート 1 を示している。シート 1 の厚さは、0 . 1 ~ 2 m m が好ましく、シートの面積は、取り扱いに便利な大きさであればよい。

第 2 a 図に平面図を示し、第 2 b 図に断面図

た。

本発明法は、検体採取から測定までを同一固相上で行うこともできるため、操作が簡便であり、検体保存および測定の高自由度が高く、感度も良好であり、病院・診療所の外来患者および健康診断などで乳頭異常分泌の認められる患者が発見された場合、ただちに乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定を行うことを可能にし、その乳頭異常分泌症の原因を医師が早期に把握し、適切な処置を施すことを可能にするものである。すなわち、本発明法は、従来行われていた血中腫瘍関連抗原の測定方法のように、測定機器を必要とせず、簡便な方法で乳頭分泌液を採取して腫瘍関連抗原を測定できるので、どのような施設でも測定が可能であり、臨床的意義が大きい。

従来、早期乳癌の発見は非常に困難であったため、発見時には既に癌が進行していたり、リンパ節に転移を起こしている症例が多く、やむを得ず乳房切除術などの大手術が必要であった

を示す例には、シート 1 が反応領域 2 を複数固相有し、この反応領域 2 は、シート 1 に設けられた凹部 5 である例に示す

第 3 a 図に平面図を示し、第 3 b 図に断面図を示す例には、シート 1 が反応領域 2 を複数固相有し、この反応領域 2 は、シート 1 上に設けられた凸状の枠 6 で囲まれている例に示す。

第 4 a 図に平面図を示し、第 4 b 図に断面図を示す例には、シート 1 上に設けられた凸部 7 が、反応領域以外のシート 1 表面すべてを覆う形状である例を示す。

反応領域の大きさおよび形状は、塗布可能な乳頭分泌液検体量と測定の容易さから適当なものを選びうる。例えば、検体量が 5 μ l であるとき、通常は 0 . 0 1 ~ 3 . 0 c m ² の面積に塗布可能である。形状を円形とした場合、約 1 ~ 2 0 m m 直径がこれに相当するが、塗布および洗浄などの測定操作の簡便性および測定の容易さから、約 2 ~ 1 5 m m の直径が好ましい。しかしながら、測定に供する検体量を増減すれ

ば、これらの値はそれに応じて変動しうることは容易に推測できる。また、検体量は、測定感度もしくは測定濃度範囲によっても変動しうるため、それらに応じて該面積の大きさも変動しうる。反応領域の形状は、塗布および洗浄などの測定操作の簡便性および判定の容易さから、円形、楕円形、正方形、長方形、もしくは他の四辺形が好ましいが、これらに限定されるものではない。

この反応領域を規定する方法としては、固相上の所定の限定された領域にのみ前記腫瘍関連抗原に対する抗体を不溶化するだけでも実施可能であるが、シート状固相上の所定の反応領域が、固相上に設けられた凸状の枠または凸部で囲まれているか、もしくは、シート状固相の凹部であることが好ましい。シート状固相を実質的に液体不透過性のプラスチック製シートとすることにより、上記加工もしくは成形が容易となる。

なお、固相上の所定の限定された領域にのみ

工などで固相表面をへこませればよい。なお、シート状固相上に一定面積の反応領域を設ける方法は、これら例示した方法に限定されるものではない。

[実施例]

以下に、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

(実施例1) 抗体を結合させたポリエステルシートを用いた乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定

- 従来法との比較 -

各腫瘍関連抗原に対する抗体が不溶化されたシートを作製し、乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定を行った。また、同一検体につき、従来法で測定を行った。

前記腫瘍関連抗原に対する抗体を不溶化することによって反応領域を規定する場合、1枚のシート状固相に複数の腫瘍関連抗原に対する抗体を不溶化し、他項目同時測定が可能な測定用器材とすることもできる。

シート状固相上の所定の反応領域を、固相上に設けられた凸状の枠で囲う方法としては、プレス加工などで凸状部を成形するか、撥水性のペイントで固相上に枠を印刷する方法が可能である。また、凸部で囲う方法としては、反応領域以外の部分を適当な手段(第4a図および第4b図に示す例えばアルミ箔4など)で被覆して凸部とし、反応領域を区分する方法が可能である。具体的には、所定の反応領域の大きさおよび形状と同じ穴をあけた適度な厚さ(0.05~1.0mm)を有するアルミ箔を、ホットメルト接着剤で固相上に加熱接着することにより、反応領域を設定できる。固相上の反応領域を、固相に設けられた凹部とする方法としては、第2b図に示すように、プレス加

1) 抗体不溶化シートの作製

ポリエステルシート(ソマール社; N500)上に、内径10mmの円形の孔を15mmの間隔をおいて打ち抜いたアルミシール(厚さ約100 μ m)を、ホットメルト接着剤で密着接合した。このシートを、十分に水洗・乾燥した。次に、76mMりん酸緩衝生理食塩水pH6.4(以下、PBSという)で0.1~5mg/mlの濃度に調製した抗体の溶液中にポリエステルシートを浸し、45℃で1時間インキュベートした後、蒸留水で洗浄した。水を良く切り、10%BSA加PBSに浸して室温で1時間インキュベートした後、液を良く切り、風乾燥し、抗体不溶化シートを得た。

なお、使用した抗体(不溶化抗体)は第1表に示した。

2) 酵素標識抗体の調製

ここでは、CA15-3に対する酵素標識抗体を調製する方法を示すが、この方法により、

他の腫瘍関連抗原に対する酵素標識抗体も調製した。

西洋わさびペルオキシダーゼ (TOYOBO 社、グレード 1-C、以下、HRPO という) 5 mg を 0.3 M 炭酸水素ナトリウム水溶液 1 mL に溶解し、これに、0.1 mL の 1% ジニトロフルオロベンゼンのエタノール溶液を加え、室温で 1 時間反応させた。さらに、60 mM 過ヨウ素酸ナトリウム溶液 1 mL を加えて 30 分間反応させ、次に、0.16 M エチレングリコール溶液 1 mL を加えて 1 時間反応させた後、0.01 M 炭酸緩衝液 pH 9.5 (以下、SCB という) に対して透析した。この溶液に、抗 CA15-3 抗体 (DF3) 5 mg を加え、室温で 3 時間反応させ、次に、5 mg の水酸化ホウ素ナトリウムを加え、4℃ で 1 晩反応させた後、PBS に対して透析し、HRPO 標識抗 CA15-3 抗体を得た。

なお、使用した抗体 (標識抗体用抗体) は第

テック東洋製、No. 131) を用いて除去し、培養上清を得た。この培養上清を、限外ろ過器 (ミリポア製) を用いて濃縮した後、ACA22 (ファルマシアー LKB 製) を用いたゲルろ過カラムクロマトグラフィーで精製した。これを、限外ろ過器を用いて濃縮し、得られた濃縮液について、第 4 表に示す従来法により、腫瘍関連抗原濃度の測定を行った。10% BSA 加 PBS を用いて目的とする濃度に希釈し、標準液とした。

なお、調製された各標準液の濃度は、第 3 表に示した。

4) 本発明法による腫瘍関連抗原の測定

乳頭異常分泌症の患者から採取した乳頭分泌液各 10 例を、検体として用いた。

1) で調製した抗体不溶化シートの各円形枠内全体に、採取直後の検体各 5 μ L を塗り広げ、乾燥させた後、1% BSA 加 PBS で

1 表に示した。

3) 標準液の調製

(a) CA15-3 標準液の調製

人乳を超遠心 (40000 \times g) し、脂肪分を除去した後、蛋白分解酵素阻害剤として PMSF とアプロチニンを添加し、限外ろ過器を用いて濃縮した。得られた濃縮液を適宜希釈し、第 4 表に示す従来法により、CA15-3 濃度の測定を行った。これを、10% BSA 加 PBS を用いて目的の濃度に希釈し、標準液とした。

(b) 癌細胞培養液からの標準液の調製

CA15-3 を除く腫瘍関連抗原の標準液は、第 2 表に示す癌細胞培養株の培養液より、以下に示す方法により調製した。

癌細胞培養液中の細胞を、濾紙 (アドバン

100 倍に希釈した HRPO 標識抗体溶液各 25 μ L を滴下し、室温で 30 分間反応させた。反応液を蒸留水で洗い流した後、シートを洗浄液 (0.05% Tween 20 加 1 M 食塩水) が入っている密封容器に入れ、激しく攪拌して洗浄した。水分を良く切った後、基質溶液 (0.5 mM TMB、0.01% H₂O₂ 含有) 各 25 μ L を滴下し、10 分間反応させた。検体の代わりに標準液を塗布した反応領域における呈色を対照とし、各検体中の腫瘍関連抗原濃度を半定量した。

結果は第 5 表に示した。

また、測定値を疾患によって分類した結果を、第 5 図～第 11 図に示した。

5) 従来法による腫瘍関連抗原の測定

第 4 表に示すキットを用い、4) と同一検体について、腫瘍関連抗原の測定を行った。

結果は第 5 表に示した。

第5表から明らかなように、両方法における測定値は良く相関した。

第5図～第11図から明らかなように、腫瘍関連抗原が高値を示したものは、全例乳癌であり、良性疾患は全例低値であった。

(実施例2) 検体塗布後の保存日数の影響の検討

乳頭異常分泌症の患者から採取した乳頭分泌液各3例(実施例1で用いた10例のうちの3例)を検体として用いた。

実施例1-1)で調製した抗体不溶化シートの円形枠内全体に、採取直後の検体各5 μ Lを塗り広げ、乾燥させた後、4℃に保存し、逐次別個に、実施例1-4)と同様の方法で、腫瘍関連抗原濃度の測定を行った。

結果は第6表に示した。

保存による測定値の変化は殆どなかった。

(pH 8.0)に対し、4℃で透析し、ALP標識抗体を得た。

3) 腫瘍関連抗原の測定

乳頭異常分泌症の患者から採取した乳頭分泌液各3例を、検体として用いた。

(a) 測定方法1

1)で調製した抗体不溶化シートの円形枠内全体に、検体各5 μ Lを塗り広げ、乾燥させた後、ALP標識抗体各10 μ Lを滴下し、室温で30分間反応させた。反応液を蒸留水で洗い流した後、洗浄液(0.05% Tween 20 加1M食塩水)が入っている密封容器に入れ、激しく攪拌して洗浄した。水分を良く切った後、基質溶液(1mg/mL 5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドリルりん酸塩(BCI P)、1mM塩化マグネシウム、0.1Mほう酸-炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.8)含有)各10 μ Lを滴下し、乾燥するまで約30

(実施例3) 測定方法の比較

1) 抗体不溶化シートの作製

ポリエステルシート(ソマール社; N500)上に、幅1mm、内径6mmの円形の枠を、10mmの間隔をおいて、白色の撥水性ペイントでシルク印刷した。このシートを十分に水洗・乾燥した後、実施例1-1)の方法で抗体を不溶化し、抗体不溶化シートを作製した。

2) 酵素標識抗体の調製

10mg/mL濃度のウシ小腸アルカリフォスファターゼ(ベーリンガー・マンハイム社、以下、ALPという)と抗体(5mg/mL)との混合溶液に、最終濃度が0.2%となるようにグルタルアルデヒドを添加し、4℃で2時間反応を行わせた後、0.1M塩化ナトリウム、1mM塩化マグネシウム、0.1%アジ化ナトリウムを含む50mMトリス塩酸緩衝液

分間、室温に放置した。円形枠内の反射率を、反射率計(Color measuring system SZ-80(日本電色工業株式会社))で測定し、検体の替わりに標準液(実施例1と同様)を塗布した円形枠内の反射率を対照とし、各検体中の腫瘍関連抗原濃度を定量した。

結果は第7表に示した。

(b) 測定方法2

1)で調製した抗体不溶化シートの円形枠内に、ALP標識抗体各10 μ Lをあらかじめ滴下しておき、ここに、測定方法1と同じ検体各5 μ Lを塗り広げ、室温で30分間反応させた。反応液を蒸留水で洗い流した後、洗浄液で洗浄を行い、以下、測定方法1と同様の方法で各検体中の腫瘍関連抗原濃度を定量した。

結果は第7表に示した。

(c) 測定方法3

測定方法1と同じ検体各5 μ LとALP標識

抗体各10 μ lとをあらかじめ混合し、その全量を、1)で調製した抗体不溶化シートの円形枠内に各々塗り広げ、室温で30分間反応させた。反応液を蒸留水で洗い流した後、洗浄液で洗浄を行い、以下、測定方法1と同様の方法で各検体中の腫瘍関連抗原濃度を定量した。

結果は第7表に示した。

第7表から明らかなように、3方法の測定結果は良く一致した。

(実施例4) 抗体不溶化ポリプロピレンシートに直接乳頭分泌液を採取する方法を用いた乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原の測定

1) 抗体不溶化シートの作製

ポリプロピレンシート(サンブラテック社: PP)を用いた以外は、実施例1-1)の方法で抗体を不溶化し、抗体不溶化シートを作製した。

液(0.5mM TMB、0.01% H₂O₂含有)を滴下し、室温で15分間インキュベートした。呈色したものを+(プラス)、呈色しなかったものを-(マイナス)として判定した。

結果は第8表に示した。

3) 従来法による腫瘍関連抗原の測定

第4表に示すキットを用い、2)と同一検体について、腫瘍関連抗原の測定を行った。

結果は第8表に示した。

第8表から明らかなように、両方法における測定結果は良く相関した。

2) 本発明法による腫瘍関連抗原の測定

検体は、乳頭異常分泌症の患者の乳頭から直接採取した。検体数は、各10例である。

ポリプロピレンシートの抗体不溶化部分を直接乳頭にあて、検体を採取、塗布した後、37℃で1時間インキュベートした。このポリプロピレンシートを、0.5%脱脂粉乳加PBSに浸して4℃で一晩インキュベートした後、濾紙を用いて水分を良く除いた。次に、1%BSA加PBSで100~1000倍に希釈したHRPO標識抗体溶液(実施例1に従って調製したもの)に上記のポリプロピレンシートを浸し、室温で1時間インキュベートした。シートを水分を除去した後、洗浄液(0.05% Tween 20加1M食塩水)が入っている密封容器に入れ、攪拌しながら1時間洗浄した。洗浄液は、15分おきに交換した。洗浄したポリプロピレンシートの水分を良く切り、基質溶

第1表 測定に使用する抗体の組み合わせ

マーカー	酵素標識用抗体	不溶化用抗体
CA15-3	DF3	115D8
CA125	OC125	OC125
CA72-4	B72.3	CC49
CA54/61	MA54	MA61
CA602	F602-6	F602-1
CA19-9	1116NS19-9	1116NS19-9
TPA	T162	T162

第2表 標準液調製に用いる癌細胞株

マーカー	癌細胞株
CA125	卵巣類中腎癌培養細胞株RMG-II
CA72-4	肺腺癌由来細胞株C1509
CA54/61	肺腺癌由来細胞株C1509
CA602	卵巣類中腎癌培養細胞株RMG-II
CA19-9	結腸癌由来細胞株SW1116
TPA	卵巣類中腎癌培養細胞株RMG-II

第3表 測定に使用する標準液濃度

マーカー	標準液濃度 ($\times 10^3$ U/ml)
CA15-3	0, 1, 2, 4, 8
CA125	0, 2, 4, 8, 16
CA72-4	0, 0.5, 1, 2, 4
CA54/61	0, 1, 2, 4, 8
CA602	0, 2, 4, 8, 16
CA19-9	0, 0.75, 1.5, 3, 6
TPA	0, 1, 5, 3, 6, 12

第4表 従来の測定方法

マーカー	キ ャ ッ ト
CA15-3	CA15-3RIAキット (セントコア社)
CA125	イムノクロンCA125 (トーレ・フジバイオニクス)
CA72-4	CA72-4RIAキット (セントコア社)
CA54/61	CA54/61EIAキット (持田製薬)
CA602	CA602EIAキット (持田製薬)
CA19-9	CA19-9RIAキット (セントコア社)
TPA	TPAキット 第一 II (第一RI研究所)

第6表 保存後の測定値

マーカー	検体	測定値 ($\times 10^3$ U/ml)			
		保 存 日 数			
		0	1	7	14
CA15-3	A	0	0	0	0
	B	2	2	2	2
	C	4	4	4	4
CA125	D	0	0	0	0
	E	4	4	4	4
	F	16	16	16	16
CA72-4	G	0	0	0	0
	H	1	1	2	1
	I	4	4	4	4
CA54/61	J	0	0	0	0
	K	2	2	2	2
	L	4	4	4	4
CA602	M	0	0	0	0
	N	2	2	2	2
	O	8	8	8	8
CA19-9	P	0	0	0	0
	Q	1.5	1.5	1.5	1.5
	R	6	6	6	6
TPA	S	0	0	0	0
	T	3	6	3	3
	U	12	12	12	12

第5表 本発明法と従来法の比較 (本法:半定量、従来法:定量)

マーカー	方法	測定値 ($\times 10^3$ U/ml)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*
CA15-3	本法	4	4	4	4	8	2	1	4	1	2
	従来法	6.8	4.0	5.3	6.4	1.7	1.5	6.1	1.2	2.8	0.5
CA125	本法	16	8	4	8	4	2	0	2	0	0
	従来法	18.3	9.3	5.2	8.3	4.9	2.6	1.4	2.0	0.3	0.5
CA72-4	本法	4	4	2	1	1	0.5	1	0	1	0
	従来法	4.3	5.7	2.8	0.8	1.1	0.9	1.3	0.2	1.9	0.1
CA54/61	本法	4	8	4	4	2	1	2	0	0	0
	従来法	4.9	8.8	5.3	5.4	2.3	1.7	1.8	0.6	0.4	0.6
CA602	本法	16	4	8	8	4	2	0	2	4	0
	従来法	15.0	5.2	9.6	8.7	4.9	1.7	0.8	2.8	3.4	1.7
CA19-9	本法	3	3	6	1.5	0.75	0.75	1.5	0.75	1.5	0
	従来法	4.4	5.1	7.3	1.4	0.6	0.8	1.7	0.8	1.3	0.1
TPA	本法	12	12	6	6	6	0	6	3	1.5	1.5
	従来法	14.2	12.7	7.8	9.3	7.3	0.7	6.9	4.9	1.8	2.2

*検体No. 但し、用いた検体はマーカー毎に異なる

第7表 測定方法の比較

マーカー	検体	測定値 ($\times 10^3$ U/ml)		
		測 定 方 法		
		(1)	(2)	(3)
CA15-3	A	0	0	0
	B	2.4	2.6	2.5
	C	4.0	4.2	4.2
CA125	D	0	0	0
	E	3.2	3.3	3.2
	F	8.1	7.8	8.0
CA72-4	G	0	0	0
	H	1.2	1.1	1.0
	I	4.5	4.4	4.4
CA54/61	J	0	0	0
	K	1.3	1.0	1.0
	L	8.1	8.0	8.2
CA602	M	0	0	0
	N	2.5	2.3	2.4
	O	7.7	7.9	7.8
CA19-9	P	0	0	0
	Q	2.9	2.9	3.0
	R	6.2	6.3	6.3
TPA	S	0	0	0
	T	3.0	3.1	3.1
	U	12.2	12.1	12.0

【発明の効果】

本発明により、微量の乳頭分泌液中の腫瘍関連抗原(CA15-3、CA125、CA72-4、CA54/61、CA601、CA19-9、TPA、MCA、MSAおよびATM-1)の測定方法および測定用器材が提供される。

本発明の測定方法および測定用器材は、検体量が微量でも測定可能であり、測定操作が簡便である。また、定性または半定量反応を行う場合は、測定用機器がなくても実施しうるので、集団検診やマスキングで容易に利用できる。

本発明の測定方法および測定用器材を用いることにより、多項目同時測定が可能となる。

また、本発明の測定方法および測定用器材を用いることにより、特に乳癌の早期診断が可能となる。

第8表 本発明法と従来法との比較(本法:定性、従来法:定量)

マーカー	方法	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CA15-3	本法	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	従来法	4.0	5.3	6.4	1.7	2.4	2.6	1.2	1.0	0.6	0.8
CA125	本法	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	従来法	8.3	6.9	8.1	4.2	10.2	3.5	1.3	0.5	1.0	0.2
CA72-4	本法	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	従来法	2.5	0.9	3.8	1.0	0.8	0.9	0.5	0.1	0.2	0.2
CA54/61	本法	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	従来法	2.7	1.8	3.5	4.3	1.5	0.6	0.2	0.8	1.0	0.4
CA602	本法	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	従来法	10.2	9.6	4.8	12.3	11.5	0.6	3.9	2.4	1.9	0.5
CA19-9	本法	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	従来法	3.2	1.3	1.0	0.8	3.8	0.7	1.2	0.4	0.2	0.5
TPA	本法	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	従来法	10.7	8.8	3.0	7.2	5.4	4.3	6.9	2.1	1.9	2.5

・検体も、但し、用いたたたマーカー毎に異なる

4. 図面の詳細な説明

第1a図は、本発明の測定用器材の一実施例の平面図、第1b図はその断面図を表わす。

第2a図は、本発明の測定用器材の他の実施例の平面図、第2b図はその断面図を表わす。

第3a図は、本発明の測定用器材の他の実施例の平面図、第3b図はその断面図を表わす。

第4a図は、本発明の測定用器材の他の実施例の平面図、第4b図はその断面図を表わす。

第5図は、実施例1における疾患別のCA15-3濃度を表わすグラフである。

第6図は、実施例1における疾患別のCA125濃度を表わすグラフである。

第7図は、実施例1における疾患別のCA72-4濃度を表わすグラフである。

第8図は、実施例1における疾患別のCA54/61濃度を表わすグラフである。

第9図は、実施例1における疾患別のCA602濃度を表わすグラフである。

第10図は、実施例1における疾患別のCA19-9濃度を表わすグラフである。

第11図は、実施例1における疾患別のTPA濃度を表わすグラフである。

符号の説明

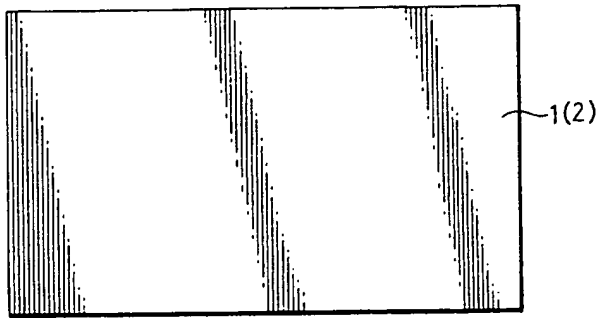
- 1 … シート、
- 2 … 反応領域、
- 4 … アルミ箔、
- 5 … 凹部、
- 6 … 凸状の枠、
- 7 … 凸部

特許出願人 持田製薬株式会社

代理人 弁理士 渡辺 望 穂

代理人 弁理士 三和 晴 子

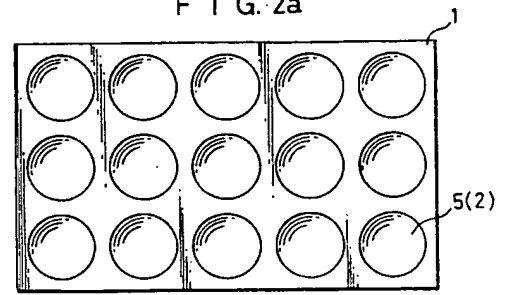
F I G. 1a



F I G. 1b



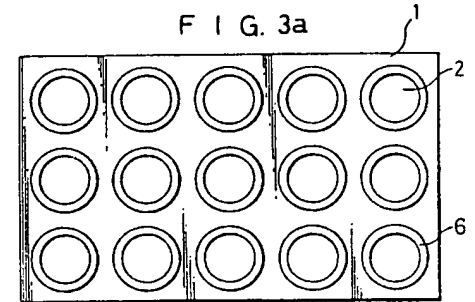
F I G. 2a



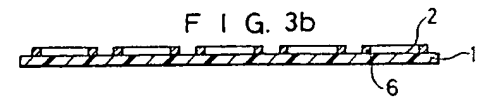
F I G. 2b



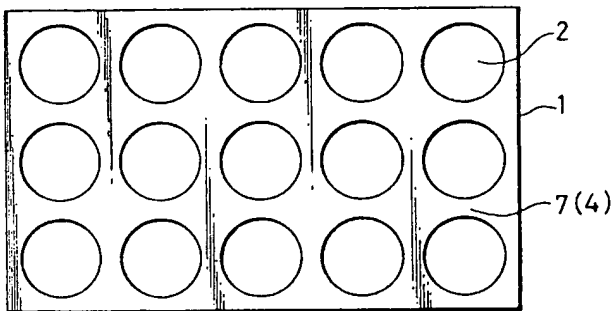
F I G. 3a



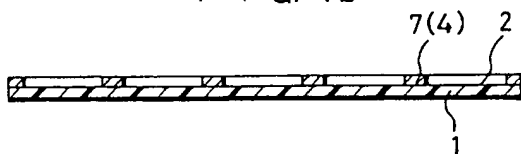
F I G. 3b



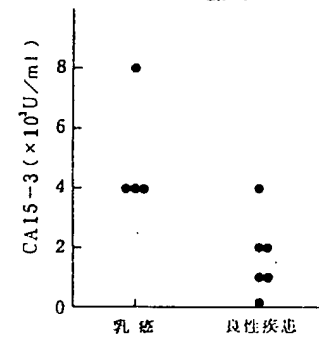
F I G. 4a



F I G. 4b



F I G. 5



F I G. 6

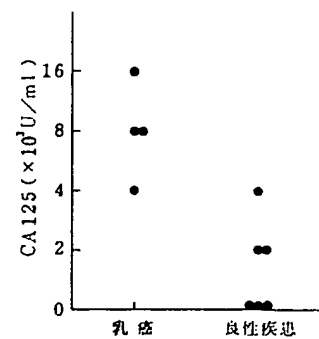


FIG. 7

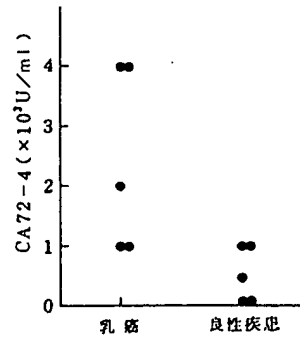


FIG. 9

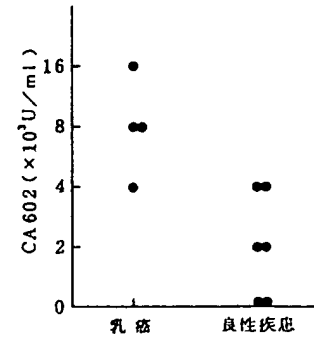


FIG. 8

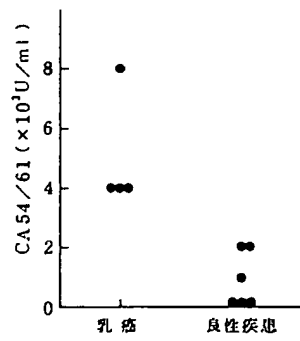


FIG. 10

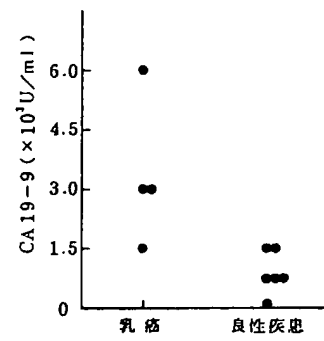


FIG. 11

